

ALKALEN FOSFATAZ (ALP) ENZİMİNİN ÖZÜTLENMESİ, İNHİBİSYONU VE KİNETİK MODELLENMESİ

Zahide Esra DURAK, Metin GÜRÜ

Gazi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü 06570-Maltepe, ANKARA/TÜRKİYE
zaesrad@hotmail.com, mguru@gazi.edu.tr

(Geliş/Received: 28.12.2012; Kabul/Accepted: 14.02.2013)

ÖZET

Bu çalışma, sıçan karaciğerinden özütlenen alkalen fosfataz (ALP) enziminin kısmen özütlenmesini, inhibitörsüz ve inhibitör varlığında kinetik özelliklerinin araştırılmasını kapsamaktadır. Deneysel sonuçlar yardımıyla Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Değerler: İnhibitörsüz $K_m=0,047$ $V_{max}=24,87$; Üre inhibitörlü $K_m=0,054$ $V_{max}=20,83$; Kreatinin inhibitörlü $K_m=0,037$ $V_{max}=20,83$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere göre enzimin substrata ilgisi ve maksimum hız tespit edildi. İnhibitör maddeyle deneyler tekrarlandı ve inhibisyon tipi belirlendi. Kandaki yüksek üre ve kreatinin seviyesinin alkalen fosfataz enzimini nasıl etkilediği bulundu. Kandaki ALP (Alkalen Fosfataz) üzerinde ürenin inhibitör olarak kullanıldığı çalışmada reaksiyonun yarışmasız (nonkompetitif) bir reaksiyon, kreatininin inhibitör olarak kullanıldığı çalışmada ise reaksiyonun yarışmacı olmayan (unkompetitif) bir reaksiyonla gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alkalen fosfataz, Michaelis Menten, yarışmasız inhibisyon, yarışmacı olmayan inhibisyon.

ISOLATION, INHIBITION AND KINETIC MODELLING OF ALKALINE PHOSPHATASE (ALP) ENZYME

ABSTRACT

This study scopes the purification of alkaline phosphatase enzyme extracted from the liver and the investigation of kinetic properties for the reactions with and without inhibitor. Michaelis Menten and Lineweaver Burk graphs were drawn by means of experimental results. K_m and V_{max} values were calculated from these graphics. According to these values, substrate affinity (K_m) and maximum velocity (V_{max}) values were determined. Values without inhibitor; $K_m=0,047$ $V_{max}=24,87$; with urea inhibitor $K_m=0,054$ $V_{max}=20,83$; with creatinin inhibitor $K_m=0,037$ $V_{max}=20,83$. The experiments were repeated with inhibitory substance and inhibition type was established. How high blood urea and creatinine levels affected alkaline phosphatase activity were determined. In this study, urea was found to cause noncompetetive inhibition and creatinine to cause uncompetetive inhibition on liver ALP.

Key Words: Alkaline phosphatase, Michaelis Menten, Lineweaver Burk, noncompetetive inhibition, uncompetetive inhibition.

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

ALP (Alkalen fosfataz enzimi) doğada yaygın olarak bulunmaktadır. İnsanlardan bakterilere kadar bütün türlerde varlığını sürdürmektedir. Bu durum, söz konusu enzimin biyokimyasal reaksiyonlarda önemli olduğunu göstermektedir [1,2]. Yapılan bazı araştırmalarda embriyonik hücre migrasyonunda ALP'nin rolü olabileceği gösterilmiştir. Özellikle uzun zincirli yağ asitlerinden zengin diyetle beslenmede bağırsak alkalen fosfataz enziminin

artması ve lipid konsantrasyonu ile bağırsak alkalen fosfataz enziminin aktivitesi arasında bir korelasyonun olması, lipid transportunda bağırsak alkalen fosfataz enziminin bir rolü olabileceğini düşündürmektedir [3].

Laboratuvar şartlarındaki çalışmalarda fosfatın geri alınmasının doğrudan inhibe edilememesi, ALP'nin fosfat transportunda indirek rolü olduğunu göstermektedir. Bağırsak hücrelerinde Pi transportunun ALP aktivitesine bağlı olarak

değişmesi enzimin böbrek ve bağırsak fosfat transportunu düzenleyebileceğini göstermektedir [4,5]. Bağırsaklarda kalsiyum emilimi ile ALP artışı paralel gitmektedir. D vitamini alınması ile bağırsak ALP enziminde 2-3 kat artma görülmektedir [6]. Plasental ALP enziminin, fetusa antikolarların geçişinde görev aldıkları iddia edilmiştir [7].

Pankreatik kanalların mutasyonu ile ortaya çıkan kistik fibrosiste levamisol gibi ALP aktivitesini azaltan ilaçlar kullanılarak kanalların açıldığı öne sürülmüştür [8]. ALP beyin mikro damarlarındaki ana enzimlerden biridir. İnsülinin beyin ALP aktivitesini belirgin şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. ALP'nin insülin ile kan-beyin bariyerini düzenleyen anahtar enzim olabileceği düşünülmektedir [9,10]. Hansen-Smith ve arkadaşları ALP enziminin azlığı ve yokluğunda kalp ve iskelet kaslarında hipoksik bölgeler oluştuğunu göstermişlerdir [11]. ALP'nin en önemli rolü iskelet mineralizasyonu üzerinedir. Kemik ALP aktivitesinin en yüksek olduğu yer osteoblastların (kemik yapım hücresi) plazma membranıdır [12].

ALP izoenzimleri değişik metotlar kullanılarak birbirinden ayrılabilir. Bunlar elektroforez, kromatografi, sıcaklık, üre, L-fenilalanin ile inhibisyon gibi metotlardır.

Bu çalışmanın amacı; kandaki yüksek üre ve kreatinin seviyesinin alkelen fosfat enzimini nasıl etkilediğini belirlemek üzere, karaciğerden özütleme ALP 'in, aktivasyonu ve inhibisyonunun Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eşitliklerinin oluşturulmasıyla incelemektir.

2. MATERYAL VE METOT (MATERIAL AND METHOD)

Deneysel çalışmada; Waring Blender, Sorval Superspeed S1 Santrifüj, Sanyo Harrier 18/80 Soğutucu Santrifüj, Heldolph Manyetik Karıştırıcı, Grant CB2 50 Z Su Banyosu, Derin Dondurucu ve Unicam-UV Visible Spektrofotometre kullanıldı. Çalışmada kullanılan kloroform, etanol ve NaCl Merck firmasından satın alındı.

İki ana bölümde yapılan çalışmaların ilk bölümünde alkelen fosfat enzimi karaciğerden izole edilerek kısmen saflaştırıldı. İkinci bölümde ise saflaştırılan enzimin Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. İnhibitörün enzimin kinetik davranışına karşı etkisi araştırıldı.

Buz içerisinde muhafaza edilen karaciğerden 4,2 g alınarak 8 ml serum fizyolojik (% 8,75 lik NaCl çözeltisi) içerisinde 3500 devirde 10 dakika homojenize edildi. Santrifüj sonucu dibe çöken kısım

atıldı ve üst kısımdaki enzimleri barındıran kısım çalışmaların devamı için 9 ml olarak ayrıldı. Bu kısımdan yağları uzaklaştırmak için homojenizatörde 15 ml kloroform-9 ml etanol karışımı ile muamele edildi ve 3500 devir/dakika hızda santrifüj edildi. Oluşan iki fazdan alttaki kısım kloroform fazı, üstteki kısım ise etanol-su fazı olarak ayrıldı. Proteinler etanol-su fazına geçerken, yağlar kloroform fazına geçerek uzaklaştırılmış oldu. Farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltilerinin hazırlanması Tablo 1 de verilmektedir. ALP enzim aktivitesi Bessey-Lowry'nin tarif ettiği metotla aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Tablo 1. Farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltilerinin hazırlanması (Preparation of substrate solutions at different concentrations.)

Özellik	Tüp1	Tüp2	Tüp3	Tüp4	Tüp5
Son Tüpteki substrat (Adenozin) Konsantrasyonu	0,1 mM	0,3 mM	1 mM	3 mM	5 mM
Substrat	0,1 mL	0,3 mL	1 mL	3 mL	5 mL
Distile Su	9,7 mL	9,3 mL	7,9 mL	2 mL	-
Serum	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL

Bu setler 1 saat 37 °C su banyosunda bekletildi. Her tüpe TCA (trikloroasetik asit) konularak protein çöktürüldü ve süzüldü. Çalışmaya süzintüden devam edildi. Böylece proteinler uzaklaştırılmış oldu. Tablo 2 de verilen madde miktarları her tüpe ilave edildi ve 15 dakika bekletilerek renk değişimi gözlemlendi. Herbir tüpün absorbansı distile suya karşı 630 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Enzim aktivitesi ADA Aktivitesi= $[(OD_{numune} - OD_{numune\ körü}) / [(OD_{standart} - OD_{standart\ körü})] \times 50$ formülüne göre önce uluslararası ünite olarak (IU: $\mu\text{mol/dk}$), sonra her bir numunenin protein miktarına (mg/mL) bölünerek spesifik aktivite cinsinden (IU/mg protein) verilmiştir.

Tablo 2. Spektrofotometrik ölçümler için kullanılan reaktifler (Reagents for spectrophotometric measurements)

Özellik	Tüp1	Tüp2	Tüp3	Tüp4	Tüp5
Süzüntü	2 mL	2mL	2mL	2mL	2mL
Askorbik Asit	0,5 mL	1mL	2mL	1mL	1mL
Sulfomolibdik Reaktifi	1 mL	1mL	1mL	1mL	1mL

Numunelerdeki protein miktarı Lowry metoduna göre spektrofotometrik olarak tayin edildi. Metodun

prensibi alkali ortamda peptidlerin (proteinlerin) Cu^{2+} iyonları ile kompleks yapması esasına dayanmaktadır ve bu kompleks 600-700 nm de maksimum absorbans vermektedir. Bovin serum albumini (BSA) kullanılarak standart grafik çizilerek grafiğin eğiminden numunelerdeki protein miktarı hesaplandı.

Optik yoğunluk spektrofotometreden okunarak kalibrasyon grafiğinden aktivite miktarları elde edildi. Hesaplanan aktivite değerleri substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe çizilerek Michaelis-Menten grafiği oluşturuldu. Daha sonra sonuçları kesinleştirmek için (1/aktivite) 'ye karşı (1/konsantrasyon) grafiği olan Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Her iki grafikten maximum hız (V_{max}) ve K_m (substratın enzime ilgisi) değerleri kaydedildi [14].

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

Protein miktarının tayininde deney tüpündeki okunan absorbans=0.263, kör tüpündeki okunan absorbans=0.051 dir. Buna göre protein miktarı = deney tüpünün absorbansı - Kör tüpün absorbansı x 20 dir. Buna göre hesaplanan değer =4.24 g/L dir.

V_{max} enzimin en yüksek hızda çalıştığı hızdır. K_m enzimin substrata ilgisini göstermekte olup, hızın hangi substrat konsantrasyonunda yarıya geldiğini ifade etmektedir. Enzim substratına ilgilise K_m değeri düşük olur, ilgisi azsa K_m değeri yüksek olacaktır [15]. Bu bilgiler ışığında sonuçları değerlendirebilmek üzere inhibitörsüz, üre ile ve kreatinin ile okunan OD (optik yoğunluk farkı) değerleri Tablo 3 de, ALP aktivite değerleri ise Tablo 4 de verilmektedir.

Tablo 3. İnhibitörsüz, üre ve kreatinin ile okunan OD (optik yoğunluk farkı) değerleri (Optic Density values of noninhibitory, urea and creatinine)

ΔOD (inhibitörsüz)	ΔOD (Üre ile)	ΔOD (Kreatinin ile)
0,149	0,13	0,136
0,178	0,113	0,147
0,185	0,171	0,157
0,236	0,191	0,19
0,225	0,229	0,195

Bu değerler $\frac{\Delta OD}{33 \times 60} \times 10^6$ formülünde yerine konularak birimler $\mu mol/L$ ye çevrildi.

Tablo 4. İnhibitörsüz, üre ve kreatinin ile okunan ALP özgül aktivite değerleri (ALP specific activity values of noninhibitory, urea and creatinine)

Substrat konsantrasyonu (mM)	Aktivite (IU/L) (inhibitörsüz)	Aktivite (IU/L) (Üre ile)	Aktivite (IU/L) (Kreatinin ile)
0,1	75,25	65,65	68,68
0,3	89,89	57,07	74,24
1	93,43	86,36	79,29
3	119,19	96,46	95,95
5	113,63	115,65	98,48

Deney sonucu bulunan protein 4,24 mg/mL (4,24 g/L) dir. $\frac{\Delta OD}{L} \times \frac{1}{4.4 \text{ g/L}} = \frac{\Delta OD \mu mol}{4.4 \text{ g}}$ denliğinden hesaplanan inhibitörsüz, üre ile ve kreatinin ile okunan ALP özgül (protein başına) aktivite değerleri Tablo 5 de verilmektedir.

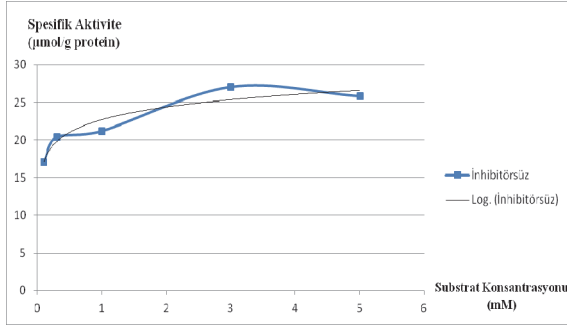
Tablo 5. İnhibitörsüz, üre ve kreatinin ile okunan ALP özgül (protein başına) aktivite değerleri (ALP specific activity values of noninhibitory, urea and creatinine)

Substrat konsantrasyonu (mM)	Aktivite (IU/mg protein) (inhibitörsüz)	Aktivite (IU/mg protein) (Üre ile)	Aktivite (IU/mg protein) (Kreatinin ile)
0,1	17,74	15,5	16,2
0,3	21,2	13,46	17,51
1	22,0	20,37	18,70
3	28,11	22,75	22,63
5	26,8	27,27	23,22

Bu değerler yardımıyla Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek eşitlikler oluşturuldu, sonuçlara göre inhibitör tipi belirlendi.

3.1. Michaelis-Menten Grafikleri (Michaelis-Menten Graphs)

Önce, Tablo 5 deki inhibitörsüz numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi alınarak Şekil 1 deki grafik oluşturuldu.



Şekil 1. İnhibitörsüz numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi (Changes of activity values depending on substrate concentrations in the studies performed by samples without inhibitor)

Grafikten V_{max} değeri okundu. Bu değer $\frac{1}{2}$ ile çarpılarak elde edilen değere karşılık gelen K_m değeri okundu. Dolayısıyla $V_{max} = 25$, $V_{max}/2 = 12,5$ olmak üzere Şekil 1 den V_{max} değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri $K_m=0,05$ olarak kaydedilmektedir. Kaydedilen değerler

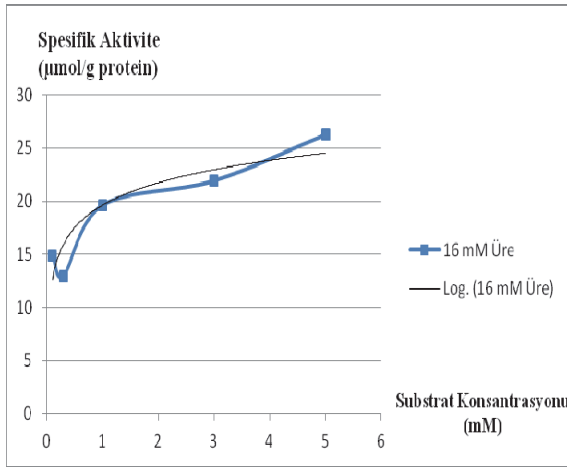
$V = V_{max} \times \frac{S}{(K_m + S)}$ şeklindeki Michaelis-Menten

eşitliğinde yerine konduğunda eşitlik

$V = 25x \frac{S}{(0,05 + S)}$ haline dönüşmektedir. Burada

V; reaksiyon hızını, S; substrat konsantrasyonunu göstermektedir [16].

İkinci olarak Tablo 5 deki üre (16 mM) katkılı numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi alınarak Şekil 2 deki grafik oluşturuldu.



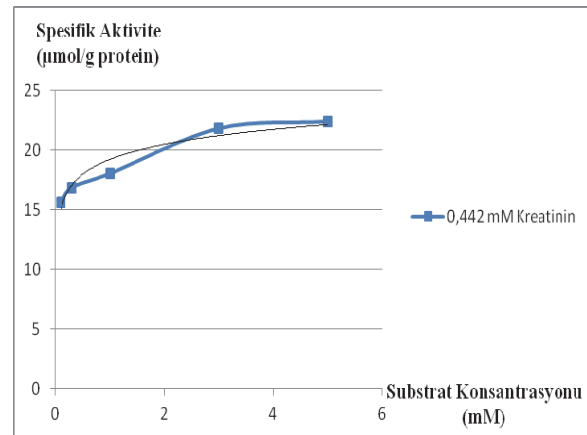
Şekil 2. 0,2 ml (16 mM) Üre inhibitörlü numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi (Changes of activity values depending on substrate concentrations in the studies performed by samples with 0,2 ml urea)

Grafikten V_{max} değeri 25 olarak okundu. Bu değer $\frac{1}{2}$ ile çarpılarak elde edilen değere karşılık

gelen K_m değeri okundu. $V_{max} = 25$; $V_{max}/2 = 12,5$ ve $K_m=0,1$ (V_{max} değerine karşılık gelen konsantrasyon) değerleri aşağıdaki Michaelis-Menten hız eşitliğinde yerine konularak Eşitlik 1 haline dönüşmektedir.

$$V = V_{max} \times \frac{S}{(K_m + S)} = 25x \frac{S}{(0,1 + S)} \quad (1)$$

Üçüncü olarak Tablo 5 deki kreatinin (0,442 mM) katkılı numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi alınarak Şekil 3 de görülen grafik oluşturuldu.



Şekil 3. 0,2 ml (0,442 mM) Kreatinin inhibitörlü numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi (Changes of activity values depending on substrate concentrations in the studies performed by samples with 0,2 ml creatinin)

Grafikten V_{max} değeri 22 olarak okundu. Bu değer $\frac{1}{2}$ ile çarpılarak elde edilen değere karşılık gelen K_m değeri okundu. $V_{max} = 22$; $V_{max}/2 = 11$ ve $K_m=0,05$ (V_{max} değerine karşılık gelen konsantrasyon) değerleri Michaelis-Menten hız eşitliğinde yerine konularak Eşitlik 2 haline dönüşmektedir.

$$V = V_{max} \times \frac{S}{(K_m + S)} = 22x \frac{S}{(0,05 + S)} \quad (2)$$

Michaelis-Menten grafiklerinden yola çıkarak; ürede V_{max} sabit kalmış, K_m artmıştır. Bu sebeple modelleme tipi, yarışmacı (competitive) olabileceği düşünülmektedir. Kreatininde ise V_{max} azalmış, K_m sabit kalmıştır. Sonuç olarak kreatinin modelleme tipi, yarışmacı olmayan (noncompetitive) inhibitör olarak etki ettiği düşünülmektedir. Fakat bu grafiklerden kesin sonuç çıkarmak mümkün değildir. Kesin sonuçları elde etmek için Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir.

3.2. Lineweaver-Burk Grafikleri (Lineweaver-Burk Graphs)

Lineweaver-Burk eşitliğini elde etmek üzere aktivite değerleri substrat konsantrasyonuna bağlı olarak inhibitörsüz, 0,016 mol/litre (16 mM) üre katkılı ve $4,42 \cdot 10^{-4}$ mol/litre (0,442 mM) kreatinin katkılı her bir durum için ölçülerek, sonuçlar Tablo 6'da verilmektedir.

Tablo 6. İnhibitörsüz, üre ve kreatinin katkılı ALP aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna bağlı değişimi (Changing of ALP activity values of noninhibitory, urea and creatinine added according to the substrat concentration)

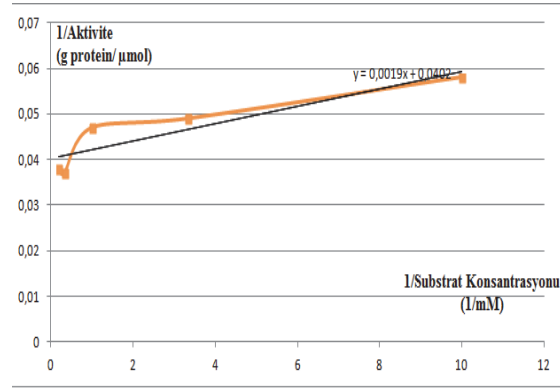
1/Substrat konsantrasyonu (1/mM)	1/Aktivite (inhibitörsüz) (g protein/μmol)	1/Aktivite (16 mM Üre ile) (g protein/μmol)	1/Aktivite (0,442 mM Kreatinin ile) (g protein/μmol)
10	0,058	0,067	0,064
3,33	0,049	0,077	0,059
1	0,047	0,051	0,055
0,33	0,037	0,045	0,045
0,2	0,038	0,038	0,044

Genel anlamda Lineweaver-Burk eşitliği aşağıda verilmekte olup, S; Substrat konsantrasyonunu, V; hızı, V_{max} ; Maksimum hızı göstermektedir.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} \times \frac{(K_m + S)}{S}$$

Bu eşitliğin sabitleri inhibitörsüz ve üre, kreatinin inhibitörlü durumları için Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6 daki grafiklerden hesaplanarak Lineweaver-Burk eşitliği geliştirildi. Önce, Tablo 6'daki inhibitörsüz numunede 1/aktivite değerlerinin 1/substrat konsantrasyonuna göre değişimi alınarak Şekil 4 deki grafik oluşturuldu.

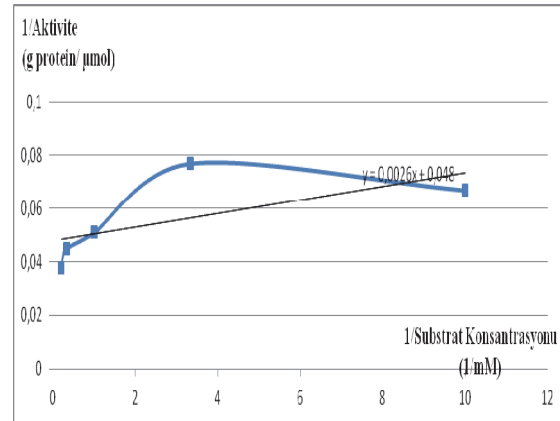
Grafığın ordinatı kestiği nokta $1/V_{max}$ olarak 0,04 değeri okundu. Dolayısıyla hız, $V_{max} = 25$ olarak kaba okumayla kaydedildi. Sabitleri daha hassas belirlemek üzere doğru denkleminin ($y=0,0019x + 0,0402$), $y=0$ değerinde K_m , $x=0$ değerinde V_{max} değeri hesaplandı. Bu şekilde, $K_m = 0,047$; $V_{max} = 24,87$ olarak hesaplandı. Sabit değerler Lineweaver-Burk eşitliğinde yerine konularak aşağıda gösterilen Eşitlik 3 elde edildi.



Şekil 4. inhibitörsüz numunede substrat konsantrasyonuna göre aktiflik katsayılarının değişimi (Changes of activity coefficients depending on substrate concentrations in the studies performed by samples without inhibitor)

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} \times \frac{(K_m + S)}{S} = \frac{1}{24,87} \times \frac{(0,047 + S)}{S} \quad (3)$$

İkinci olarak Tablo 6 daki üre (16 mM) katkılı numunede 1/aktivite değerlerinin 1/substrat konsantrasyonuna göre değişimi alınarak Şekil 5 deki grafik oluşturuldu.

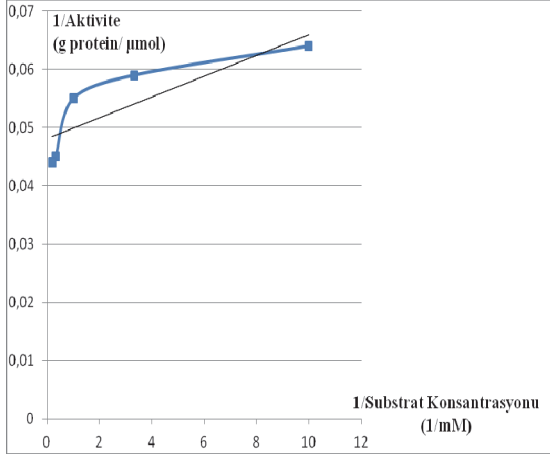


Şekil 5. 16 mM üre inhibitörlü numunede substrat konsantrasyonuna göre aktiflik katsayılarının değişimi (Changes of activity coefficients depending on substrate concentrations in the studies performed by samples with 16 mM urea)

Grafikten kaba olarak okunan $1/V_{max} = 0,049$ değeri ile $V_{max} = 20,4$ olarak kaydedildi. Daha duyarlı değerler elde etmek üzere doğru denklemi ($y = 0,0026x + 0,048$), $y=0$ değerinde K_m , $x=0$ değerinde V_{max} değeri hesaplandı. Bu şekilde, $K_m = 0,054$; $V_{max} = 20,83$ olarak hesaplandı. Sabit değerler Lineweaver-Burk eşitliğinde yerine konularak aşağıda gösterilen Eşitlik 4 elde edildi.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} \times \frac{(K_m + S)}{S} = \frac{1}{20,83} \times \frac{(0,054 + S)}{S} \quad (4)$$

Üçüncü olarak Tablo 5 deki kreatinin (0,442 mM) katkılı numunede aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonuna göre değişimi alınarak Şekil 6' da görülen grafik oluşturuldu.



Şekil 6. 0,442 mM kreatinin inhibitörlü numunede substrat konsantrasyonuna göre aktiflik katsayılarının değişimi (Changes of activity coefficients depending on substrate concentrations in the studies performed by samples with 0,442 mM creatinin)

Grafikten kaba olarak okunan $1/V_{\max} = 0,047$ değeri ile $V_{\max} = 21,27$ olarak kaydedildi. Daha duyarlı değerler elde etmek üzere doğru denklemi ($y = 0,0018x + 0,0481$), $y=0$ değerinde K_m , $x=0$ değerinde V_{\max} değeri hesaplandı. Bu şekilde, $K_m = 0,037$; $V_{\max} = 20,83$ olarak hesaplandı. Sabit değerler Lineweaver-Burk eşitliğinde yerine konularak aşağıda gösterilen Eşitlik 5 elde edildi.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} \times \frac{(K_m + S)}{S} = \frac{1}{20,83} \times \frac{(0,037 + S)}{S} \quad (5)$$

Sonuçlardan yola çıkarak; ürenin inhibitör olarak kullanıldığı çalışmada K_m değeri artmış, V_{\max} değeri azalmış. Bu reaksiyon yarışmasız (noncompetitive) bir reaksiyondur. Yani, substrat ne kadar artırılırsa artırılınsın maksimum hıza ulaşamamaktadır. Kreatininin inhibitör olarak kullanıldığı çalışmada K_m değeri azalmış, V_{\max} değeri sabit kalmıştır. Bu reaksiyon yarışmacı olmayan (uncompetitive) bir reaksiyondur. Bu inhibisyonda enzimin substratına karşı ilgisi artmasına rağmen, substratın artması ile maksimum hıza ulaşamamaktadır.

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Karaciğerden alkelen fosfataz enzimi izole edilerek kısmen saflaştırılmıştır. Böylece enzimin kinetik davranışı incelenmiştir.

Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden K_m ve V_{\max} değerleri bulunmuştur.

İki inhibitör madde mevcudiyetinde deneyler tekrarlanarak V_{\max} ve K_m değerleri hesaplanarak inhibisyon tipi belirlenmiştir. Değerler: İnhibitörsüz $K_m = 0,047$ $V_{\max} = 24,87$; Üre inhibitörlü $K_m = 0,054$ $V_{\max} = 20,83$; Kreatinin inhibitörlü $K_m = 0,037$ $V_{\max} = 20,83$ olarak hesaplanmıştır.

ALP vücutta kemik oluşumunu sağlayan enzimdir. Fosfatları parçalar böylece serbest fosfat ortama geçer. Bu fosfat da kalsiyumla birleşerek kemik yapısını oluşturur.

Böbrek yetmezliği durumunda üre ve kreatinin böbrekten süzülemediği için kanda birikir. Çalışmada gözlemlenen olay; kandaki yüksek üre ve kreatinin seviyesi alkelen fosfataz enzimini nasıl etkilediğini belirlemektir. Sonuçta böbrek yetmezliği yaşayan hastaların kemik zayıflığında üre ve kreatininin dolayı ALP'nin düşmesinin önemli olabileceği ortaya konmuştur. Bu da bize ALP aktivatörleri kullanılarak bu hastalarda kemik yapısının düzelmesi ve iyileşmesi sağlanabileceğini göstermektedir. Bu konuyla ilgili ileri çalışmalar yapılarak hastaların kemik yapılarının düzelmesi ekonomik ve pratik bir yöntemle sağlanabilir. Bunun sonucu böbrek hastalarının kemik yapısı problemlerin çözümlenebileceği ortaya konmuştur.

Sonuçlarımız, karaciğer alkelen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine hücrel toksik yapılar olan kreatininin ve ürenin oluşturduğu inhibisyonun tipini ve bunlar ile ilgili kinetik sabitleri vermektedir. Bu sonuçlar her iki toksik kimyasal maddenin de alkelen fosfatazın aktivitesi üzerine önemli inhibisyon oluşturduğunu göstermektedir. Bu durum böbrek yetmezliği gibi bir durumda kandaki seviyesi artan üre ve kreatinin aynı zamanda başka enzimatik yapıları da inhibe ederek zararlı sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir.

SEMBOLLER (SYMBOLS)

ALP : Alkelen Fosfataz

BSA : Sığır Serum Albümini

K_m : Michaelis sabiti

TCA : Trikloroasetik asit

V_{\max} : Maximum hız

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Jakob A., Bryjak J., Wojtowicz H., Illeova V., Annus J., Polakovic M., "Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating", **Food Chemistry**, No 123, 369–376, 2010.
2. Biasutti M., Abuin E., Silber J., Correa M., Lissi E., "Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants", **Advances in Colloid and Interface Science**, No 136, 1–24, 2008.
3. Wilin'ska A., Bryjak J., Illeova V., Polakovic M., "Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer", **International Dairy Journal**, No 17, 579–586, 2007.
4. Ásgeirsson B., Guðjónsdóttir K., "Reversible inactivation of alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*) in urea", **Biochimica et Biophysica Acta**, No 1764, 190–198, 2006.
5. Van Hoof V., De Broe M.E., "Interpretation and Clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns." **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 197-293, 1994.
6. Behnke M, Kemper H, Kruse D and Müller-Wiefel, "Bone alkaline phosphatase in children with chronic renal failure", **Nephrology Dialysis Transplantation**, No 13, Oxford University Press, Yayın 3, 662-667, 1998.
7. Becq F., Fanjul M., Merten M., "Possible regulation of CFTR-chloride channels by membrane-bound phosphates in pancreatic duct cells", **Proceeding of the National Academies of Sciences of the United States of America (PNAS)**, No 327, 337-342, 1993.
8. Day A. P., Feher M. D., Chopra R., "Triglyceride fatty acid chain length influences the post prandial rise in serum intestinal alkaline phosphatase activity", **Annals of Clinical Biochemistry**, No 29, 287-291, 1992.
9. Garrett RH, Grisham CM., **Biochemistry**, Second Edition, Saunders College Publishing, 426-427, 1999.
10. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., **Lehninger principles of biochemistry**, New York: W.H. Freeman, 2005.
11. Leskovic, V., **Comprehensive enzyme kinetics**, New York: Kluwer Academic/Plenum Pub., 2003.
12. Walsh R, Martin E, Darvesh S., "Limitations of conventional inhibitor classifications", **Integr Biol (Camb)**, No 3, 197-201, 2011.
13. Stephenson FH., **Calculations for Molecular Biology and Biotechnology**, Academic Press, An Imprint of Elsevier, Amsterdam, 2003.
14. Sutton R, Rockett B, Swindells P., **Chemistry for the Life Sciences**, 1st ed., London, 2000.
15. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnosis**, 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006.
16. Alan Wu., **Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests**, 4th ed. Elsevier Saunders, 2006.

